

Е. Н. ПАРАВЯН

ИЗУЧЕНИЕ СВИНЕЦ-РЕАКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ НЕРВНЫХ СТРУКТУР МОЗГА НА СВЕЖЕЗАМОРОЖЕННЫХ СРЕЗАХ

Методом выявления свинец-реактивных субстанций изучались нервные структуры различных отделов мозга на свежемороженых срезах с последующей фиксацией в формалине. Установлены различия в реакционной способности нейронов разных отделов мозга, которые трудно уловить нейрогистологическими и некоторыми гистохимическими методами исследования.

Установлен факт вариабельности выявления СРС у разных животных, что, по всей вероятности, связано с функциональным состоянием структур.

Использование соединений свинца в микроскопической технике представляет большой интерес, поскольку преципитация свинца в клеточных структурах происходит за счет связывания внутриклеточного неорганического фосфора, играющего важную роль в энергетических и обменных процессах. Продукт преципитации условно называется свинец-реактивной субстанцией (СРС).

Установление закономерности концентрационного взаимоотношения ингредиентов инкубационной смеси позволяет производить целенаправленное осаждение золи фосфата свинца в различных клеточных структурах [6].

Выявление СРС на кусочках свежей ткани [1—6, 8] позволило установить возможность получения богатой морфологической картины, напоминающей результат окраски, получаемый методом Гольджи. Однако вследствие небольшой глубины окраски использование этого метода в экспериментальных исследованиях становится затруднительным. Поэтому исключительно важное значение приобретают поиски путей выявления СРС на свежемороженной или фиксированной ткани [6, 8].

В настоящем исследовании изучалось влияние различных звеньев обработки материала на стабилизацию СРС нейронов мозга свежемороженной ткани.

Материал и методика. Исследовались различные отделы головного и спинного мозга 25 кошек. Животные декапитировались, извлекался головной и спинной мозг и из различных отделов мозга готовились замороженные срезы в 50 мк. Часть срезов непосредственно после промывки в воде переносилась в инкубационную смесь, другая часть фиксировалась в 5% нейтральном формалине (30 мин, 1, 2, 3 и 24 часа), промывалась в дистиллированной воде (30 мин, 1, 2, 3 и 24 часа) и переносилась в инкубационные смеси, состоящие из 0,38% раствора уксуснокислого свинца, к 100 мл которого прибавлялись различные количества 1 М ацетатного буфера (от 5 до 35 мл, с интервалом в 5 мл) с pH 5,6 и 5,9. В этих растворах срезы инкубировались при 37° от 3 до 120 дней.

Далее промывались дистиллированной водой, выявлялись сернистым натрием, снова промывались и заключались в глицерин-желатин.

Результаты и обсуждение. Наиболее удовлетворительные результаты получены после 1—1,5 час. фиксации в формалине и 1-часовой промывки. Длительная фиксация и промывка ухудшают окраску структур.

Анализ результатов выявления СРС на свежемороженых срезах показал, что при использовании 5—10 мл буфера во всех отделах мозга видна хорошая окраска сосудисто-капиллярной стенки. При этих количествах и особенно при 15 мл, наряду с капиллярами, в коре больших полушарий окрашиваются верхушечные дендриты пирамидных клеток, а в стволе—перикарионы единичных нервных клеток. При больших количествах буфера на препаратах видна бесструктурная зернистость, а окраска структур, как правило, отсутствует.

Поскольку основная масса нейронов мозга не проявляет реакционной способности после замораживания, а откладывающийся на срезах адсорбированный осадок затрудняет идентификацию структур, то использование свежемороженых срезов для выявления СРС нервных структур не представляется возможным.

Более интересные данные были получены после формалиновой фиксации свежемороженых срезов.

В больших полушариях головного мозга с малыми количествами буфера (5—10 мл) наблюдается смешанная окраска капилляров, ядер клеток, верхушечных дендритов пирамидных клеток и единичных крупных пирамид с короткими отростками. При увеличении количества буфера окрашиваются ядра. У значительной части животных основная масса нейронов коры не проявляет реакционной способности. Однако у некоторых животных при 30—35 мл буфера выявляются различные нейроны коры, напоминая результат окраски по Ниссли. Перикарион клеток окрашивается в виде черной мелкой зернистости, отростки и ядра не выявляются.

На срезах мозжечка, инкубированных с 5—10 мл буфера, выявляются капилляры, ядра и интенсивно окрашенные горизонтальные нервные волокна в молекулярном слое, а в зернистом—окраска волокон не наблюдается. Однако с повышением количества буфера в смеси наблюдается обратное соотношение: выявляются нервные волокна зернистого слоя и исчезает окраска волокон молекулярного слоя. При 20—25 мл на отдельных участках препарата выявляются тела клеток Пуркинье с основными дендритами. Окраска перикариона и дендритов носит мелкозернистый характер, ядро клетки не реагирует (рис. 1). Нейроны молекулярного и зернистого слоя не проявляют реакционной способности. На рис. 2 видна реакция нейронов зубчатого ядра мозжечка с 20—30 мл буфера. Отростки клеток прослеживаются на небольшом от тела расстоянии. Осадок в перикарионе гранулярный.

На препаратах продолговатого мозга с 5 мл буфера выявляются капилляры, ядра и тела единичных нервных клеток. С 10—20 мл на зернистом фоне препарата четко вырисовываются различные нервные ядра.

Нервные клетки выделяются за счет зернистого осадка, откладывающегося в перикарионе и коротких отростках. У большинства исследованных животных нейроны ядер блуждающего и подъязычного нервов про-



Рис. 1. Мозжечок кошки. Окраска перикарионов и основных дендритов клеток Пуркинье. Выявление СРС, рН 5,9 (20 мл буфера), свежемороженые срезы с последующей фиксацией в формалине. Ок. 6, об. 20.

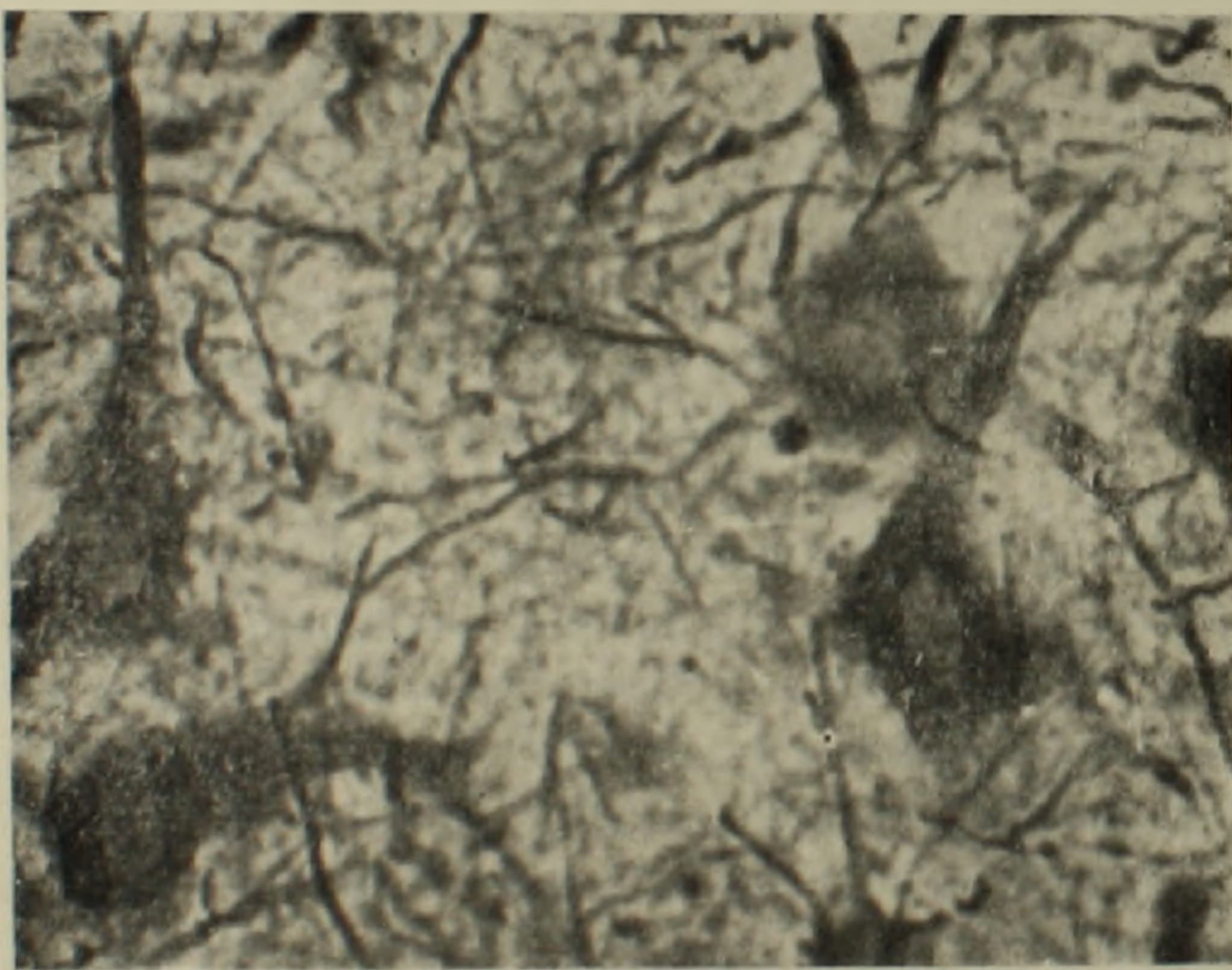


Рис. 2. Окраска нейронов зубчатого ядра мозжечка. Выявление СРС, рН 5,9 (25 мл буфера). Свежемороженые срезы с фиксацией в формалине. Ок. 10, об. 20.

являют более постоянную реакцию, чем нейроны других ядер. Постоянством реакции отличаются также как мелкие, так и крупные нейроны ретикулярной формации, у которых с малыми количествами буфера выявляются зернистые перикарионы с отростками, окрашивающимися на коротком от тела клетки расстоянии. С увеличением количества буфера

выявляемость отростков значительно улучшается. На рис. 3 видны нервные клетки, отростки которых прослеживаются на далеком расстоянии. Выявляются вторичные и третичные разветвления дендритов. С 25—30 мл окраска нейронов ядер блуждающего и подъязычного нервов отсутствует, однако выявляются нейроны других ядер. На наш взгляд, значительный интерес представляет наличие специфичности в реакции нейронов. Они четко окрашиваются в одних метамерных ядрах, в то время как в соседних ядрах реакция их может полностью отсутствовать.

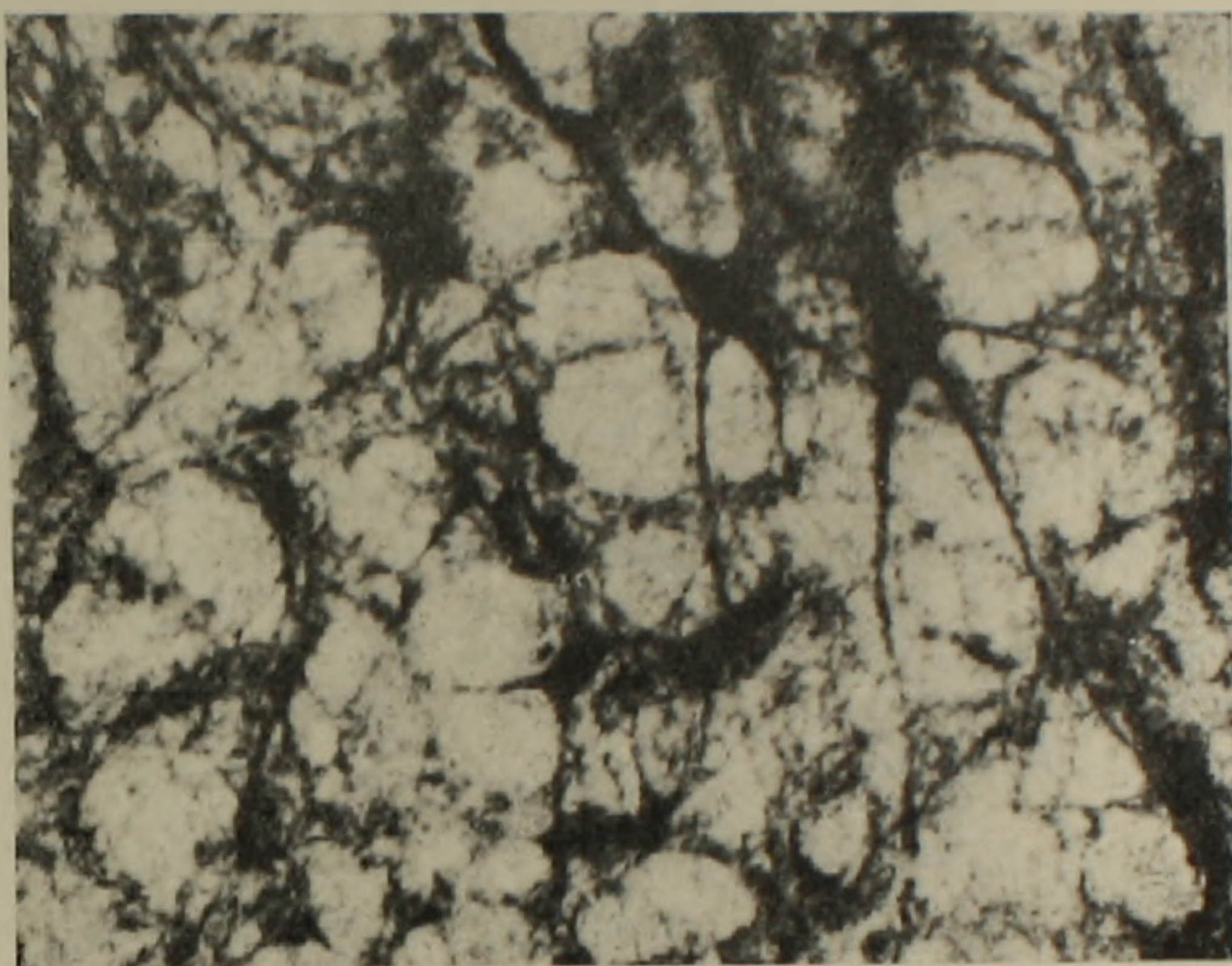


Рис. 3. Продолговатый мозг кошки. Окрашены нервные клетки с четко выраженными вторичными и третичными разветвлениями дендритов. Выявление СРС, рН 5,9 (30 мл буфера), свежемороженые срезы с фиксацией в формалине. Ок. 10, об. 20.

В среднем мозгу наиболее постоянно окрашиваются нейроны красного ядра и ретикулярной формации.

Анализ препаратов спинного мозга показал, что с 5 мл буфера равномерно окрашиваются капилляры. С 10—15 мл наряду с капиллярами выявляется несколько мотонейронов с зернистым перикарионом. Отростки видны на близком от тела клетки расстоянии. С 25—35 мл выявляется значительное количество нейронов боковых и передних рогов. Отростки клеток длинные, ядра клеток в основном не окрашиваются. Весьма интересно, что нейроны задних рогов не проявляют реакционной способности во всех использованных нами вариантах исследования.

Приведенные данные позволяют заключить, что СРС сосудисто-капиллярной стенки не подвергается существенным изменениям после замораживания и выявляется достаточно четко как на свежемороженых, так и на срезах с последующей фиксацией в формалине. Однако СРС нервных структур в основном подвергается блокированию на свежемороженых срезах. Формалиновая фиксация последних вызывает

некоторую активацию СРС нейронов, реакционная способность которых существенно отличается в разных отделах мозга.

Нейроны мозга проявляют реактивность в двух пиках: с 10—15 и 25—35 мл буфера. По первому пику реагируют пирамидные нейроны коры, мотонейроны спинного мозга, клетки Пуркинью, а также нейроны ядер блуждающего и подъязычного нервов. По второму пику выявляются нейроны боковых и передних рогов спинного мозга, а иногда и нейроны коры больших полушарий. Нейроны ретикулярной формации имеют более широкий диапазон реактивности (15—35 мл).

Значительный интерес представляет, на наш взгляд, факт вариабельности окраски нервных структур у разных животных, проявляющийся нередко в полном отсутствии реакции СРС. Поскольку обработка ткани и выявление СРС проводились в одинаковых условиях, то, по всей вероятности, вариабельность эта связана с функциональным состоянием нервных структур, и на этом основании можно говорить о чувствительности выявления СРС. Об этом свидетельствуют также данные, полученные методом выявления СРС интрамуральных нейронов при различных функциональных состояниях кишечника.

Институт физиологии
им. Л. А. Орбели АН АрмССР

Поступило 2.VII 1973 г.

Ի. Ն. ՊԱՌԱՎՅԱՆ

ԿԱՊԱՐԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎ ՆՅՈՒԹԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՂԵՂԻ ՆԵՐՎԱՅԻՆ
ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ԹԱՐԸ ՍԱՌԵՑՎԱԾ ԿՏՐՎԱԾՔՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել են ուղեղի տարբեր բաժինների ներվային կառուցվածքները կապարային ակտիվ նյութի հայտնաբերման մեթոդով (ԿԱՆ) թարմ սառեցված կտրվածքների վրա, որոնք հետազայում ենթարկվել են ֆորմալինային ֆիքսացիայի: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ուղեղի տարբեր բաժինների նեյրոնները տարբերվում են իրենց ռեակցիոն հատկություններով, որոնք ի հայտ չեն գալիս նեյրոհիստոլոգիական և որոշ հիստոքիմիական մեթոդներով: Մեծ կիսագնդերի և ուղեղիկի կեղևի նեյրոնների հիմնական մասսան սառեցումից հետո կորցնում է իր ռեակցիոն ունակությունները, այն դեպքում, երբ երկարավուն ուղեղի նեյրոնները և, մասնավորապես, թափառող և ենթալեզվային ներվի կորիզները, ինչպես նաև ցանցանման զոյացության բջիջները հայտնաբերվում են բավական ցայտուն:

Պարզվել է, որ տարբեր կենդանիների մոտ ԿԱՆ-ը տարբերվում է իր ռեակցիոն հատկություններով, որը հավանաբար կապված է նրանց կառուցվածքների ֆունկցիոնալ վիճակի հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Паравян Е. Н. Журн. эксп. и клин. медицины, 4, 4, 1964.
2. Паравян Е. Н. Свинец-реактивные субстанции капилляров мозга и активность фосфомоноэстераз центральной нервной системы у представителей различных классов позвоночных. Диссертация на соискание ученой степени канд. биол. наук, 1966.
3. Чилингарян А. М. Тез. юбилейной конф. научн. об-ва АГЭ Грузии, 1961.
4. Чилингарян А. М. Мат-лы научно-методической конференции АГЭ с/х ВУЗ-ов, вып. II, 1963.
5. Чилингарян А. М. Тез. VII Всесоюзн. съезда АГЭ, 1966.
6. Чилингарян А. М. Микроскопическое изучение сосудов и нервной ткани, осисванное на применении соединений свинца. Диссертация на соискание ученой степени доктора биол. наук, 1968.
7. Чилингарян А. М., Аглинцян Т. С. XI съезд Всесоюзн. физиол. об-ва им. И. П. Павлова, 2, 1970.
8. Чилингарян А. М. Мат-лы второго всесоюзн. симп. «Структурная и функциональная организация мозжечка», 1971.